

麝香保心丸对动脉粥样硬化斑块和缺血心肌中血管新生影响的实验研究

沈 伟¹ 范维琥¹ 施海明¹ 李 勇¹ 罗心平¹ 张晓龙²
朱 军¹ 金 波¹ 李 剑¹ 潘俊杰¹

摘要 目的 应用麝香保心丸干预动脉粥样硬化和心肌梗死动物双模型, 同步观察麝香保心丸对动脉粥样硬化和缺血心肌中血管新生的影响。方法 20只雄性新西兰大白兔, 制备动脉粥样硬化和心肌梗死双模型, 随机分为两组。高脂组为高脂饮食对照组, 保心丸组为高脂饮食加麝香保心丸药物干预组。测定心功能及主动脉弓斑块阳性面积。采用免疫组化染色测定梗死边缘区和主动脉血管壁CD34阳性反应强度, 测定梗死边缘区新生血管密度。采用Western blot检测血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)的表达。结果 保心丸组的心功能水平较高脂组改善, 两组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。保心丸组斑块阳性面积(%)为 45.82 ± 3.68 , 较高脂组(82.56 ± 4.97)减少, 差异有统计学意义($P<0.01$)。在梗死边缘区, 保心丸组的CD34阳性反应强度和新生血管密度高于高脂组, VEGF和VEGFR-2的表达亦强于高脂组($P<0.01$); 在主动脉血管壁, 保心丸组的CD34阳性反应强度低于高脂组, VEGF和VEGFR-2的表达亦低于高脂组($P<0.01$)。结论 麝香保心丸能促进梗死边缘区血管新生, 改善心功能; 同时可抑制动脉粥样硬化斑块内血管新生。

关键词 麝香保心丸; 血管新生; 动脉粥样硬化; 心肌梗死

Effects of Shexiang Baoxin Pill on Angiogenesis in Atherosclerosis Plaque and Ischemic Myocardium SHEN Wei, FAN Wei-hu, SHI Hai-ming, et al *Department of Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of Shexiang Baoxin Pill (SBP) in intervening atherosclerosis and myocardial infarction (AS-MI) in experimental animals, and inspect its influences on angiogenesis. **Methods** Twenty male New-Zealand rabbits were made into AS-MI model, and randomly divided into 2 groups equally. Group A was fed with high-fat diet for control; Group B was fed with high-fat diet but intervened with SBP. The cardiac function and the positive area of plaque were determined. The CD34 positive response intensity at infarcted marginal zone and aorta vessel wall, and the capillary density of myocardium were measured by immunohistochemical staining. In addition, the protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) were detected by Western blot. **Results** Compared to Group A, the cardiac function was obviously improved ($P<0.05$) and the plaque positive area (%) was significantly decreased in Group B (45.82 ± 3.68 vs 82.56 ± 4.97 , $P<0.01$). The CD34 positive response intensity and the capillary density as well as VEGF and VEGFR-2 expressions in infarcted marginal zone in Group A were higher than those in Group B ($P<0.01$); but these parameters at aorta vessel walls were lower in Group A than in Group B ($P<0.01$). **Conclusion** SBP could advance the angiogenesis in the marginal zone of infarction, improve heart function, and embarrass angiogenesis in atherosclerotic plaque.

KEY WORDS Shexiang Baoxin Pill; angiogenesis; atherosclerosis; myocardial infarction

在冠心病治疗中, 活血疗法及其方药的研究是我国中西医结合领域相当活跃并取得较大进展的一个方面。麝香保心丸治疗冠心病有着悠久的历史, 临床实践证明

有显著的抗心肌缺血作用, 药理研究发现麝香保心丸具有扩张冠状动脉、保护血管内皮、抑制动脉粥样硬化以及减少心肌梗死面积、预防心室重构等作用, 近年的研究还证实了其促进缺血心肌血管新生的作用^[1, 2]。中药的双向调节作用对人体在病理状态下所产生的功能失调起到平衡调节作用, 这是中药药理의 深奥之处。因此, 我们设计应用麝香保心丸干预动脉粥样硬化和心肌梗死动物双模型, 在同一生物体内同步观察麝香保心丸对动

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30873350); 上海市卫生局基金项目(No. 2009006)

作者单位: 1. 复旦大学附属华山医院内科(上海 200040);
2. 复旦大学附属华山医院放射科

通讯作者: 范维琥, Tel: 13901993978, E-mail: whfann@gmail.com

脉粥样硬化和缺血心肌中血管新生的影响。

材料与方法

1 动物 健康雄性新西兰兔20只, 2月龄, 体重2.7~3.0 kg, 由复旦大学实验动物科学部提供, 动物生产许可证SYXK(沪)2007-0002。

2 药物 麝香保心丸由人工麝香、人参提取物、人工牛黄、肉桂、苏合香、蟾酥和冰片组成, 每丸重22.5 mg, 由上海和黄药业有限公司生产。

3 试剂与仪器 数字减影血管造影C臂机(GE公司, 美国); 各型导管及介入器材(COOK Torcon NB[®] Advantage, 美国); 高分子液体栓塞剂(贝朗医疗国际贸易有限公司, 上海); VEGF和VEGFR-2抗体(ADL, 美国); EnVision试剂(Dako, 丹麦); SMUP-E型生物信号处理系统(嘉龙教仪厂, 上海); MFLab200心功能应用程序(复旦大学医学院生理教研室); 医学图像分析软件(申腾信息技术有限公司, 上海)等。

4 模型制作及分组方法 20只兔随机分成两组。高脂饮食对照组(简称高脂组), 高脂饲料配方为普通饲料1 000 g; 胆固醇粉15 g; 猪油80 g, 喂养9周; 高脂饮食加麝香保心丸药物干预组(简称保心丸组)。第3周末, 在拥有数字减影血管造影C臂机的导管室进行急性心肌梗死模型的制备。术前动物禁食12 h, 予速眠新0.2 mL/kg肌注全身麻醉。右侧股动脉切开, 送入5F动脉鞘。将预先塑形的5F COOK Torcon NB[®] Advantage导管作为指引导管, 至左侧冠状动脉口, 行冠状动脉造影。将0.014F导引钢丝送入左前降支(LAD)远端, 再将微导管沿钢丝送至LAD远端。抽除钢丝, 缓慢弹性推送封闭胶(超液态碘油与高分子液体栓塞剂的混合物)至微导管头端, 从而封堵LAD远端, 引发急性心肌梗死^[3]。

5 给药方法 保心丸组每天每只给予2粒, 生理盐水溶化后灌胃9周。此为前期预实验及我科研究生剂量的探索, 这一剂量动物既能耐受, 又能观测到药物作用^[4]。高脂组给予等量蒸馏水, 连续灌胃9周。

6 心功能测定 实验终点透视下经股动脉鞘送入5F COOK导管至左心室心尖部, 行左心室造影, 并将导管头端摆放至心尖部同一位置。肝素生理盐水冲洗导管, 延长线接压力换能器, 利用SMUP-E型生物信号处理系统测定心功能相关参数: 左心室舒张末压(LVEDP)、左心室收缩压(LVSP)、室内压上升段最大变化率(+dp/dt max)。

7 标本制作 心脏标本取材: 实验终点时, 将心脏短轴水平横切, 在梗死边缘区切取组织标本, 一部分放入液氮保存, 另一部分放入10%中性甲醛液中固定24 h。动

脉标本取材: 实验终点时, 胸主动脉横截分段液氮保存, 剩余动脉置入10%中性甲醛液中保存固定24 h。其中取主动脉弓血管, 纵向剖开, 行苏丹红染色。

8 CD34阳性反应强度及新生血管密度测定 用Herxheimers液[苏丹红(g): 70%乙醇(mL): 丙酮(mL) = 1:100:100]对主动脉弓行大体染色20 min, 数码照像机照相, 应用图像分析系统测量斑块面积、血管总面积, 计算斑块面积百分比。采用EnVision法^[5]行CD34免疫组化染色, 阳性反应强度=阳性反应面积/平均光密度。染色呈棕黄色为阳性, 参照Kaku T等^[6]介绍的方法, 在低倍镜下选择CD34标记的新生血管密度高的区域, 100倍镜下计数3个视野, 取其平均值, 管腔大于8个红细胞直径的血管不计在内。

9 VEGF和VEGFR-2的蛋白表达测定 提取组织的总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。以 β -actin作为等量蛋白质上样对照, 取50 μ g蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳, 并转移至PVDF膜上, 在5%BSA溶液中室温封闭1 h, 加入VEGF和VEGFR-2单克隆抗体(1:250)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(1:1 000)室温孵育1 h, 增强化学发光显色系统显色, 暗室内X光底片感光成像, 用成像分析系统分析蛋白条带的灰度值。

10 统计学方法 用SPSS 13.0 进行统计分析, 检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 1例因导管嵌顿致室颤死亡, 1例因钢丝穿破冠脉致心包填塞死亡, 1例因灌胃不当而死亡。至实验终点, 高脂组为9只, 保心丸组为8只。兔高脂饮食后没有发生腹泻等消化道症状。

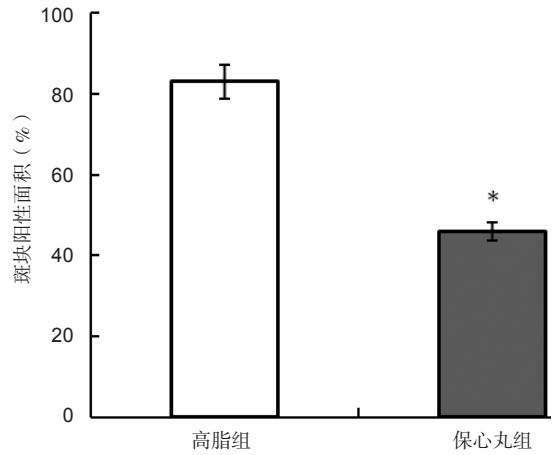
2 两组第9周末心功能各项指标测定结果比较(表1) 保心丸组的心功能水平较高脂组改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 两组主动脉斑块阳性面积测定结果(图1) 采用苏丹红染色, 通过图像分析系统测量主动脉弓的斑块面积、血管总面积, 计算斑块阳性面积百分比。保心丸组的主动脉斑块阳性面积[(45.82 $\pm$ 3.68)%]少于高脂组[(82.56 $\pm$ 4.97)%], 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 两组第9周末心功能各项指标测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LVEDP (mm Hg)	LVSP (mm Hg)	+dp/dtmax (mm Hg/s)
高脂	9	0.63 $\pm$ 0.60	68.80 $\pm$ 4.77	2011.57 $\pm$ 89.35
保心丸	8	-3.18 $\pm$ 0.71*	83.96 $\pm$ 1.67*	2734.38 $\pm$ 170.92*

注: 与高脂组比较, * $P < 0.05$



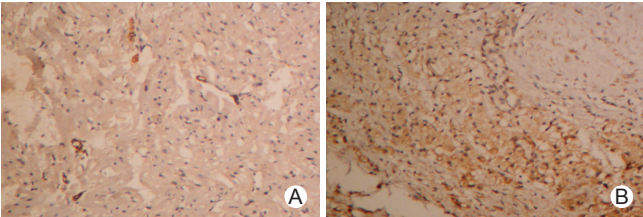
注：与高脂组比较，* $P < 0.01$
图1 两组主动脉斑块阳性面积测定结果

4 两组梗死边缘区CD34阳性反应强度及新生血管密度比较（表2，图2）在梗死边缘区，保心丸组的CD34阳性反应强度和新生血管密度高于高脂组，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。

表2 两组梗死边缘区CD34阳性反应强度及新生血管密度比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

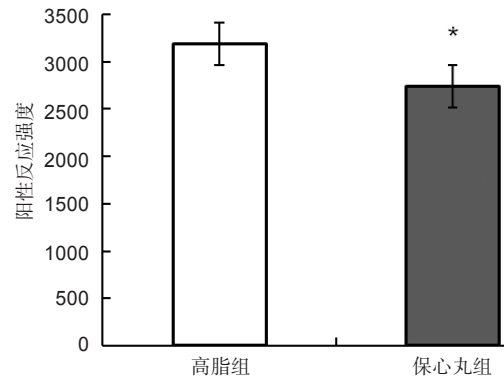
组别	n	阳性反应强度	新生血管密度（根/mm ² ）
高脂	9	1252.89 ± 169.31	14.48 ± 3.79
保心丸	8	1704.60 ± 16.48*	20.56 ± 1.75*

注：与高脂组比较，* $P < 0.01$



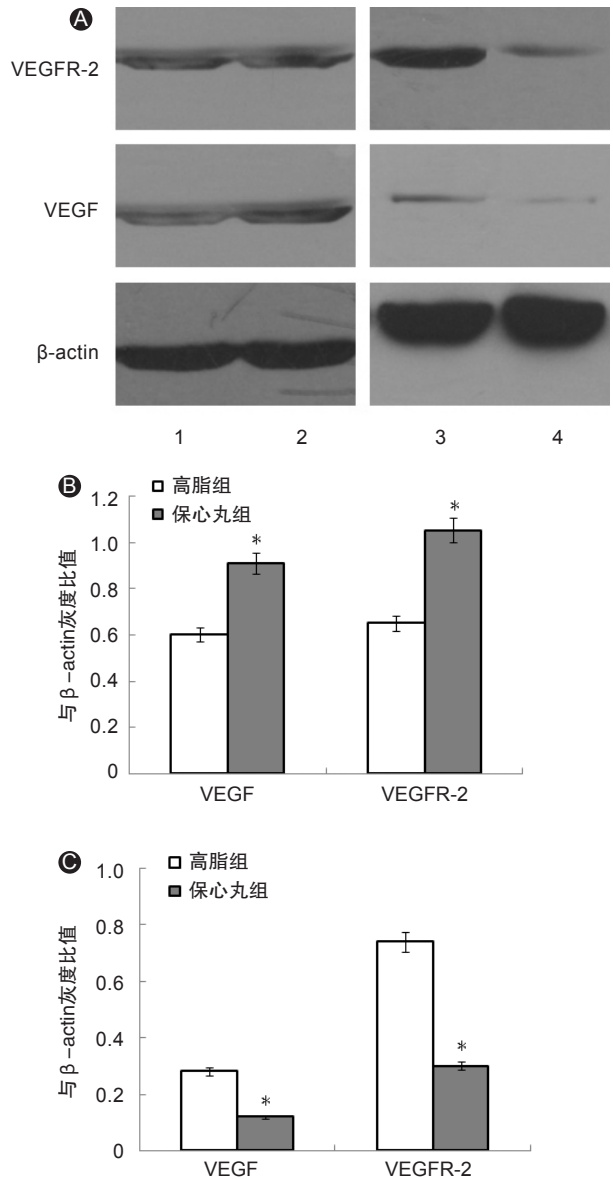
注：A：高脂组；B：保心丸组
图2 两组心肌组织免疫组化染色结果（×100）

5 两组主动脉CD34阳性反应强度比较（图3）采用CD34免疫组化染色，测定两组主动脉血管壁CD34阳性反应强度。保心丸组的CD34阳性反应强度较高脂组显著降低，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。



注：与高脂组比较，* $P < 0.01$
图3 两组主动脉CD34阳性反应强度比较

6 两组梗死边缘区和主动脉血管壁VEGF及VEGFR-2表达比较（图4）采用Western blot检测。在梗死边缘区，保心丸组VEGF和VEGFR-2的表达强于高脂组；而在主动脉血管壁，保心丸组VEGF和VEGFR-2的表达却低于高脂组。



注：与高脂组比较，* $P < 0.01$ ；其中A为蛋白电泳图；1：高脂组梗死边缘区；2：保心丸组梗死边缘区；3：高脂组主动脉；4：保心丸组主动脉；B为两组梗死边缘区VEGF和VEGFR-2表达比较；C为两组主动脉血管壁VEGF和VEGFR-2表达比较

图4 两组梗死边缘区和主动脉血管壁VEGF及VEGFR-2 Western blot分析结果

讨 论

血管新生是缺血心肌的重要代偿机制，同时血管新生又是动脉粥样硬化斑块不稳定的重要因素。促血管新生的临床治疗效果必须兼顾这对矛盾的平衡和统一。从疾病发生

的角度,同时关注和研究血管新生在动脉粥样硬化及缺血心肌中的发病机制及不同病理意义,就显得尤为重要^[7-9]。

中医药在冠心病心肌缺血中治疗性血管新生的研究,积累了丰富的临床治疗经验。中医学理论中的“气血相关”、“活血化瘀”以及对于冠心病范畴的具体治法:如“行气通脉”、“活血化瘀”、“补气活血”和“养血滋阴”等,这些理论可能和治疗性血管新生相关。我们运用中西医结合的理论,以双向调节为切入点,设计制备动脉粥样硬化和心肌梗死动物双模型,在同一生物体内同步观察麝香保心对动脉粥样硬化斑块和缺血心肌中血管新生的影响,深入探讨抗心肌缺血中药麝香保心丸双向调节血管新生的可能机制。

我们通过高脂饮食和导管介入的干预方法,制备建立兔动脉粥样硬化和心肌梗死动物双模型。模型的建立为血管新生在动脉粥样硬化和缺血心肌中发病机制的研究提供平台,也为药物干预的疗效评价提供平台。在此基础上,我们设计应用麝香保心丸灌胃干预动脉粥样硬化和心肌梗死动物双模型,同步观察麝香保心丸对动脉硬化斑块和缺血心肌中血管新生的影响。我们的研究结果提示:保心丸组的心功能水平较高脂组改善;而保心丸组的主动脉斑块阳性面积少于高脂组。在梗死边缘区,保心丸组的CD34阳性反应强度和新生血管密度高于高脂组;而在主动脉血管壁,保心丸组的CD34阳性反应强度较高脂组显著降低。VEGF是目前已知的功能最强的促有丝分裂素,能特异性作用于血管内皮细胞,诱导内皮细胞的增生、迁移,在生理性和病理性血管新生过程中发挥着重要作用。VEGF及其受体VEGFR-2通路是血管新生发生的主要通路。我们的研究提示,在梗死边缘区,保心丸组VEGF和VEGFR-2的表达强于高脂组;而在主动脉血管壁,保心丸组VEGF和VEGFR-2的表达却低于高脂组。

故我们认为麝香保心丸能够促进梗死边缘区血管新生,改善心功能;同时可抑制斑块内血管新生。提示麝香保心丸对血管新生可能起到双向调节作用。

参 考 文 献

[1] Wang S, Zheng Z, Weng Y, et al. Angiogenesis and anti-

angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts[J]. Life Sci, 2004, 74 (20) : 2467-2478.

[2] 王丽洁,罗心平,王涌,等.冠心病稳定性心绞痛患者长期应用麝香保心丸的临床耐受性与安全性评价[J].中国中西医结合杂志,2008,28(5):399-401.

Wang LJ, Luo XP, Wang Y, et al. Evaluation on tolerability and safety of long-term administration with Shexiang Baoxin Pill in patients with coronary heart disease of stable angina pectoris[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28 (5) : 399-401.

[3] 沈伟,范维琥,施海明,等.导管介入冠状动脉封堵兔急性心肌梗死模型的建立[J].中国实验动物学报,2008,16(3):161-165. Shen W, Fan WH, Shi HM, et al. Establishment of acute myocardial infarction model of rabbit by catheterization in coronary artery[J]. Acta Labor Anima Sci Sini, 2008, 16 (3) : 161-165.

[4] 李天奇,李勇,范维琥.麝香保心丸和辛伐他汀对兔股动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J].中华老年心脑血管病杂志,2006,8(5):296-299.

Li TQ, Li Y, Fan WH. Effects of Shexiang Baoxin Pill and simvastatin on stability of atherosclerotic plaque in rabbit femoral artery[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2006, 8 (5) : 296-299.

[5] Vincent L, Soria C, Mirshahi F, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors *in vitro* and angiogenesis *in vivo* models[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22 (4) : 623-629.

[6] Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma[J]. Cancer, 1997, 80 (4) : 741-744.

[7] Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45 (4) : 530-544.

[8] Serini G, Napione L, Arese M, et al. Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2008, 78 (2) : 213-222.

[9] Matsumura M, Fukuda N, Kobayashi N, et al. Effects of atorvastatin on angiogenesis in hindlimb ischemia and endothelial progenitor cell formation in rats[J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16 (4) : 319-326.

(收稿:2010-02-08 修回:2010-09-09)